

(19)



KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

KOREAN PATENT ABSTRACTS

(11)Publication number: 1020000062140 A
(43)Date of publication of application: 25.10.2000

(21)Application number: 1019990045180
(22)Date of filing: 14.10.1999

(71)Applicant: BIOSAPOGEN CO., LTD.
KIM, BONG SEOB
(72)Inventor: KIM, BONG SEOB

(51)Int. Cl. A61K 35 /78

(54) PREPARATION METHOD OF GINSENG SAPONIN

(57) Abstract:

PURPOSE: Provided is a preparation method of scarce saponin having anti-cancer activity by hydrolyzing sugar part of ginseng saponin using saponin glucosidase. CONSTITUTION: A preparation method of ginseng saponin having high biological activity such as anti-cancer activity is composed of using saponin enzyme, enables hydrolyzing glucose chain of saponin. The enzyme is obtained from bacterium, mould, yeast, malt or bran. A saponin Rh2 having high biological activity such as anti-cancer activity is prepared by hydrolyzing protopanaxdiol-type ginseng saponin by saponin beta-glucosidase. A saponin Rh1 having high biological activity such as anti-cancer activity is prepared by hydrolyzing protopanaxtriol-type ginseng saponin Re, Rf, Rg1 or Rg2 by saponin beta-rhamnosidase.

COPYRIGHT 2001 KIPO

Legal Status

Date of request for an examination (19991014)
Notification date of refusal decision ()
Final disposal of an application (registration)
Date of final disposal of an application (20020225)
Patent registration number (1003292590000)
Date of registration (20020307)
Number of opposition against the grant of a patent ()
Date of opposition against the grant of a patent ()
Number of trial against decision to refuse ()
Date of requesting trial against decision to refuse ()

BEST AVAILABLE COPY

(19) 대한민국특허청 (KR)
(12) 등록특허공보 (B1)

(51) . Int. Cl. ⁷
A61K 35/78

(45) 공고일자 2002년03월20일
(11) 등록번호 10-0329259
(24) 등록일자 2002년03월07일

(21) 출원번호 10-1999-0045180
(22) 출원일자 1999년10월14일

(65) 공개번호 특2000-0062140
(43) 공개일자 2000년10월25일

(30) 우선권주장 99112764.1 1999년03월17일 중국 (CN)

(73) 특허권자 김봉섭
중국 요령성 대련시 중산구 남산가 1-1-7-1호 14
주식회사 바이오사포젠
정상수
서울 강남구 역삼2동 776-12 화일빌딩 501호

(72) 발명자 김봉섭
중국요령성대련시보정가2호

(74) 대리인 박용환

(54) 효소(酵素)로 인삼 사포닌 당기(糖基)를 변화시켜서 희소한 인삼사포닌을 제조하는 방법

본 발명은 사포닌(saponin) 글루코사이드(glucoside) 분해효소를 이용하여 인삼 사포닌의 당기(糖基)를 가수분해(hydrolysis)하여 희소한 항암(抗癌) 사포닌을 제조하고자 한다.

일반적인 섬유소 효소(cellulase)와 헤미섬유소 효소(Hemi-cellulase)는 다당체 당기(多糖體 糖基)를 가수분해할 수 있으나, 사포닌 당기(糖基)를 분해하기는 어렵다. 그 이유는 사포닌은 비당체(非糖體) 아글리콘(aglycone)기(基)를 가지고 있기 때문에 특별한 사포닌 분해효소만이 사포닌 당기(糖基)를 분해할 수 있다. 본 발명에서 사포닌 분해효소, 예를 들면 사포닌 알파-글루코시다제(알파-glucosidase)로 프로토파낙사다이올계 진세노사이드(protopanaxadiol-type ginsenosides)의 사포닌 당기(糖基)를 분해하여서 고 항암 사포닌인 진세노사이드 Rh2를 얻을 수 있으며 그 수율(收率)은 40-80%이다.

또한 알파-람노시다제(알파-Rhamnosidase)로 진세노사이드 Rg2 당기(糖基)를 분해하여서 진세노사이드 Rh1을 제

조(또한 진세노사이드 Re를 가수분해하여서 진세노사이드 Rg1을 제조)할 수 있고 수율(收率)은 40-80%이다. 또한 사포닌 분해효소로 혼합 인삼 사포닌을 반응시켜서, 향암 사포닌인 진세노사이드 Rh2, Rh1의 함량이 높은 혼합 사포닌을 제조할 수 있다. 또한 인삼에 사포닌 분해효소를 생성하는 균을 배양하여 향암 사포닌인 진세노사이드 Rh2, Rh1의 함량이 높은 인삼분말과 인삼편(片) 및 기타 제품을 만들 수 있다.

효소(酵素)로 인삼 사포닌 당기(糖基)를 변화시켜서 희소한 인삼 사포닌을 제조하는 방법

본 발명은

인삼 사포닌을

효소(酵素)로

인삼 사포닌 당기(糖基)를 변화시켜서 희소한 인삼 사포닌을 제조하는 방법

본 발명은 효소(酵素)로 인삼 사포닌 당기(糖基)를 변화시켜서 생리 활성이 높은 희소한 인삼 사포닌을 제조하는 방법에 관한 것이다.

인삼은 식물 분류학적으로 Araliaceae과(科)의 인삼속(屬)에 속하며, 4가지 종(種)과 기타 여러가지 변종이 있다. 예를 들면 인삼(人蔘, *Panax ginseng*), 서양삼(西洋蔘, *Panax quinquefolium*), 진칠삼(田七蔘 또는 七蔘, *Panax notoginseng*), 죽절삼(竹節蔘, *P. japonicus*) 등과 이들의 다른 변종들이 있다. 인삼 사포닌은 사포닌 아글리콘(aglycone)의 구조에 따라서 프로토파낙사다이를계 진세노사이드(Protopanaxadiol-type ginsenosides), 프로토파낙사트라이올계 진세노사이드(Protopanaxatriol-type ginsenosides), 그리고 올레아놀린 산(酸)계 진세노사이드(Oleanolic acid-type ginsenosides)의 세가지로 분류될 수 있다. 인삼 특유의 약리활성 사포닌인 진세노사이드 유도체들은 담마란계의 트리테르페노이드(Triterpenoid)인 프로토파낙사다이어올과 프로토파낙사트라이올에 글루코오스, 람노오스, 아라비노오스 또는 자일로오스 같은 당류가 결합한 화합물들로서, 인삼(*Panax*)속(屬) 식물에만 존재하는 특유의 사포닌이며, 인삼중의 사포닌 함량은 약 4-6%(6년산 인삼)이다. 현재까지 고려인삼에서 34종에 이르는 유도체들이 밝혀져 있으며, 이러한 인삼 사포닌은 아글리콘에 결합되어 있는 당의 종류나 결합된 당류의 수 또는 결합위치에 따라 약리효능이 각각 다르다는 것이 이미 밝혀져 있다. 특히 수삼이나 백삼에 함유되어 있는 주요 사포닌, 그리고 최근에는 홍삼에만 존재하는 미량사포닌의 약리효능에 관해서도 많은 연구결과가 발표되고 있다. 특히 본 발명에 의해 제조할 수 있는 진세노사이드 Rh1, Rh2는 광범위한 항암 효과가 있는 홍삼 사포닌으로서 F9 teratocarcinoma(기형암 세포) 배양시험에서 가장 강력하게 종양세포의 재분화를 유도하는 작용이 있으며(Lee 등, Proc. 6th Intl. Ginseng symp., 127, 1993), 진세노사이드 Rh2는 Morris간암세포(Odashima 등, Europ. J. Cancer, 15, 885, 1979)와 B16 melanoma(흑색 종양세포), MK-1(위암세포)(Matsunaga 등, Chem. Pharm. Bull., 38, 3480, 1990) 및 난소암세포(HRA)(Kikuchi 등, Anticancer Drugs, England, 2, 63, 1991) 등 여러 종의 배양 암세포에 강력한 증식억제 활성을 나타내는 것으로 보고되었다. (Matsunaga 등, Chem. Pharm. Bull., 37, 1279, 1992) 또한 난소암 세포(HRA)를 이식한 생체내 시험에서 항암제인 시스플라틴(Cisplatin)과 병용투여했을 때나 단독투여했을 때 독성이나 부작용이 거의 없는 것으로 알려져 있으며(Tode 등, J. Cancer Res. Clin. Oncol., 120, 24, 1993), 난소암 발생억제와 생존기간 연장효과가 시스플라틴(Cisplatin)과 유사하였다. (Kikuchi 등, Anticancer Drugs, England, 2, 63, 1991) 한편 홍삼은 수삼을 수증기 처리하여 제조하는데 이 과정에서 화학구조적으로 불안정한 진세노사이드 아글리콘의 C-20위치에 결합되어 있는 배당체의 결합이 쉽게 가수분해된다. 따라서 홍삼에는 프로사포게닌(prosapogenin)인 진세노사이드 Rh1, Rh2, Rg2, Rg3등이 수삼이나 백삼에 비해 월등히 많이 함유되어 있다. 특히 항암 사포닌인 진세노사이드 Rh2는 백삼에는 존재하지 않으며(Kitagawa 등, 일본약학잡지, 103, 612, 1983), 홍삼에서의 함량은 1/100,000, 산삼에서도 4/100,000의 함량만 존재하고 있다. 이와 같이 미량사포닌인 Rh1, Rh2등은 화학적인 분해 방법(De Mayo 등, Canad. J. Chem., 43, 2033, 1965)이나 효소적인 방법(Kitagawa 등, Tetrahedron Letters, 30, 2283, 1974), 그리고 배당체의 합성을 이용한 방법(대한민국 특허공고 1995-0007250호 등)에 의해 제조하려는 시도가 많이 있었으나 제조과정상 여러 단계를 거쳐야 하고, 목적성분의 소실이 일어나거나 식용에 부적합한 촉매를 사용하는 경우로 인해 산업화되기 어려웠으며, 무엇보다도 낮은 수율로 인해 대량생산이 불가능하였다. 예를 들어, 효소적인 방법에서도 일반적인 섬유소(纖維素) 효소(cellulase)와 반섬유소(半纖維素) 효소(Hemi-cellulase) (예를 들면 섬유소 알파-글루코시다제, 섬유소 알파-람노시다제)는 인삼 사포닌 당기(糖基)를 가수분해하기 어렵다. 그 이유는 섬유소와 달리 사포닌 당기(糖基)에는 비당기(非糖基) 아글리콘이 있기 때문에 특정한 사포닌 분해효소만이 사포닌 당기(糖基)를 가수분해하여 최소한 사포닌을 제조할 수 있다. 따라서 본 발명은 이러한 문제점을 극복한 기술로서 인삼중에 함량이 높은 진세노사이드 Ra류(類), Rb류(類), Rc, Rd와 Rg3 등을 효소적 방법으로 당기(糖基)를 부분적으로 분해해서 항암성이 높은 고부가가치의 진세노사이드 Rh2를 제조할 수 있다. 동일한 방법으로 프로토파낙사트라이올계 진세노사이드인 Re, Rf, Rg1과 Rg2 등의 당기(糖基)를 가수분해하는 방법으로 진세노사이드 Rh1을 제조할 수 있다.

본 발명은 사포닌 글루코사이드 분해효소로 인삼 중에 함량이 높은 사포닌의 당기(糖基)를 가수분해하여 최소한 사포닌을 제조하는 것이다.

사포닌 당기(糖基)를 가수분해할 수 있는 알파-글루코시다제, 알파-람노시다제 등 사포닌 분해효소를 이용하여 인삼속(人蔘屬)에 속하는 모든 종류의 인삼, 예를 들면, 파낙스 진생(*Panax ginseng*), 파낙스 노토진생(*Panax notoginseng*), 파낙스 퀸케폴리움(*Panax quinquefolium*), 파낙스 야포니쿠스(*Panax japonicus*), 파낙스 슈도진생(*Panax pseudoginseng*) 등이나 또는 이들의 식물의 잎이나 조직배양물 또는 가공처리한 홍삼등을 이용하여 사포닌 분자의 당기(糖基)를 부분적으로 가수분해하여 새로운 최소한 사포닌을 만든다.

사포닌 분해효소는 미생물(微生物), 예를 들어 세균(細菌, bacterium), 곰팡이(菌類, mould), 효모(酵母, yeast) 등에서 발효법으로 얻을 수 있고 또한 인삼(人蔘), 맥아(麥芽), 맥부(밀기울) 중에서 추출될 수 있다.

사포닌 알파 - 글루코시다제로 프로토파낙사다이를제 진세노사이드를 가수분해하여 희소한 사포닌인 진세노사이드 Rh2를 제조할 수 있다.

사포닌 알파 - 람노시다제로 프로토파낙사트라이올제 진세노사이드인 진세노사이드 Re를 가수분해하여 진세노사이드 Rg1를 제조하고, 진세노사이드 Rg2를 가수분해해서 진세노사이드 Rh1를 제조할 수 있다.

사포닌 분해효소로 인삼 혼합 사포닌을 처리하여서 희소한 사포닌인 진세노사이드 Rh2, Rh1 함량이 높은 혼합 사포닌을 얻을 수 있다. 또한 사포닌 분해효소를 생성하는 균(菌)을 직접 인삼분말과 인삼조각에 배양하여 희소한 사포닌 함량이 높은 인삼분말, 인삼조각 및 기타 제품을 얻을 수 있도록 한 것으로 실시(實施)한 예를 들어서 상세히 설명하면 다음과 같다.

- 실시예 1 -

3%의 옥수수가루, 1% 인삼추출물과 0.01% MgSO₄가 포함되어 있는 배지(culture medium)에 고온호기성균(高溫好氣性菌, Bacillus sp. JF)을 60°C하에서 30 - 40시간을 통풍 배양하고 원심분리기로 균체를 제거하여 50 - 80%의 에틸알콜(ethyl alcohol) 용액으로 효소단백(酵素蛋白)을 침전시킨 다음 단백질을 수집하여서 동결건조시키면 사포닌 분해효소를 제조할 수 있다.

상기(上記)의 사포닌 분해효소 1g을 140ml 생리식염수에 혼합하고 3g의 진세노사이드 Rg3를 20ml 초산(醋酸; 0.02M, pH 5.0)과 40ml 에틸알콜에 용해시킨다. 이 두가지 용액을 혼합시킨 후 60°C하에서 저속으로 교반하면서 12시간 정도 반응을 시킨다. 반응 후 800ml의 에틸알콜을 넣고 여과하여 단백침전물을 얻는다. 과량의 에틸알콜로 침전물을 씻는다. 여과액은 감압(減壓)하에서 증발하여 건조시킨다. 그러면 진세노사이드 Rh2함량이 50 - 85% 되는 사포닌 1.5 - 2g을 얻을 수 있다.

- 실시예 2

인삼을 15목(目)이 되게 분쇄시킨 후 3배 용량의 초산나트륨(0.02M, pH5 - 6)용액을 넣는다. 40°C 하에서 저속으로 교반하면서 1 - 3시간동안 추출한다. 그 후 여과하여 불순물을 제거, 상층액(上層液)에 에틸알콜(ethyl alcohol) 넣어서 효소단백(酵素蛋白)을 침전시킨 다음 단백질을 수집하여서 동결건조시키면 사포닌 분해효소가 된다. 상기 실시예 1의 방법으로 이렇게 제조된 사포닌 분해효소로 진세노사이드 Rg3를 처리하면 진세노사이드 Rh2를 얻을 수 있다.

- 실시예 3

3% 맥부(밀기울)와 1% 인삼분말이 포함되어 있는 배지(culture medium)에 국균(麹菌, 누룩균)을 넣어서 28 - 30°C에서 60 - 80시간 통풍배양을 하여서 원심분리기로 균체를 제거하고 50 - 80%의 에틸알콜 용액으로 효소단백(酵素蛋白)을 침전시킨 다음 단백질을 수집하여서 배양액의 1/10 용량의 초산나트륨 용액(0.02M, pH5.0)에 녹이고 원심분리법으로 불순물을 제거하면 효소액을 얻을 수 있다.

3g의 진세노사이드 Rd를 100ml 초산용액(0.02M, pH5.0)에 용해시킨 후 50ml의 상기 효소액을 넣는다. 40°C하에서 6 - 24시간을 반응시키면 진세노사이드 F2가 된다. 그 다음 1/3용량의 부탄올(Buthanol)을 넣고 사포닌을 3번 추출하여 감압(減壓)하에서 증발하여 건조시킨다. 유기산(有機酸, 예를 들면 질산, 초산, 염산, 황산 등)이 진세노사이드 F2 분자의 제 20 탄소위치의 당기(糖基)를 가수분해시켜서 진세노사이드 Rh2로 전환시킨다. 이를 실리카겔 칼럼(Silica-gel column) 분리법으로 분리하면 0.5 - 1.4g의 진세노사이드 Rh2를 제조할 수 있다. 같은 방법으로 프로토파낙사다이를제 진세노사이드 Rb1 과 Rc로부터 진세노사이드 Rh2를 제조할 수 있다.

- 실시예 4

국균(麹菌) 배양액의 균체(菌體)를 제거한 후 에틸알콜을 넣어서 50-80% 정도까지 되게 한다. 효소단백(酵素蛋白)을 침전시킨 다음 단백질을 수집하여서 초산(醋酸)나트륨 용액(0.02M, pH5.0)에 용해시킨다. 이온교환수지(DEAE-Cellulose) 칼럼을 이용하여 알파-람노시다제를 분리시켜서 동결건조(凍結乾燥)시킨다.

10g의 프로토파낙사다이올게 진세노사이드 Re를 200ml 초산(醋酸)나트륨용액(0.02M, pH5.0)에 용해시킨 후, 알파-람노시다제를 넣어서 40°C하에서 12시간 동안 반응시킨다. 그 후 100°C하에서 30분 동안 가열시킨 후 여과하여 단백질을 침전물을 분리하고 대공수지(大孔樹脂, Macroporous Resin) AB-8에 흡착시킨 후 500ml의 70% 에틸알콜로 세척한 후 감압(減壓)하에서 증발 건조하면 4-5.5g의 진세노사이드 Rg1이 얻어진다. 동일한 방법으로 10g의 진세노사이드 Rg2를 처리하면 진세노사이드 Rh1 4-6g을 얻을 수 있다.

- 실시예 5

실시에 1의 Bacillus sp. JF균을 발효시켜 만든 효소 0.3 Ig과 혼합 사포닌 10g을 200ml의 초산(醋酸)나트륨 용액(0.02M, pH5.0)에 용해시킨 후 40°C하에서 12시간 반응시키고 고속액체크로마토그래피법(HPLC)으로 정량분석한 결과 80% 이상의 사포닌이 최저 한 개의 당기(糖基)를 잃게 되어 최소한 항암 사포닌인 진세노사이드 Rh1, Rh2함량이 50-200배 증가된다. 반응액을 가열시켜서 효소단백(酵素蛋白)을 제거한 후 200g 대공수지(大孔樹脂) AB-8에 흡착시킨 후 500ml의 90% 에틸알콜로 세척, 그 다음 감압하여 건조하면 6-7g 되는 진세노사이드 Rh1, Rh2함량이 높은 혼합 사포닌을 얻을 수 있다.

- 실시예 6

국균(麹菌)을 수분함량이 50-150%가 되는 인삼조각 혹은 분말 50g에 106-108C.F.U./ml농도로 접종(接種)시키고 28-38°C하에서 2-3일을 배양시키고 건조시키면 사포닌 함량이 높은 인삼을 얻을 수 있다. 고속액체크로마토그래피법(HPLC)으로 정량분석한 결과 40-80%의 사포닌이 최저 한개의 당기(糖基)를 잃게 되어 최소한 항암 사포닌인 진세노사이드 Rh1 40-60mg, Rh2 50-80mg이 함유된 인삼조각 혹은 분말을 얻을 수 있다.

이와 같은 본 발명에 의해 제조되는 사포닌 또는 혼합 사포닌은 식품, 화장품, 의약품, 시약 및 공산품 등의 원료로 사용할 수 있다.

청구항 1.

알파-글루코시다제, 알파-람노시다제를 포함하는 사포닌 분해효소로 인삼속(人蔘屬)의 인삼 사포닌을 가수분해 처리하여 사포닌 분자의 당기(糖基)가 부분적으로 가수 분해를 통하여 수삼, 백삼에는 미량 존재하거나 존재하지 않는 사포닌을 홍삼, 산삼에 존재하는 사포닌으로 전환시킴을 특징으로 하는 인삼 사포닌을 제조하는 방법

청구항 2.

제 1 항에 있어서, 사포닌 분해효소는 세균(細菌, bacterium), 곰팡이(菌類, mould), 효모(酵母, yeast)에서 발효법으로 얻을 수 있고 또한 인삼(人蔘), 맥아(麥芽), 맥부(밀기울) 중에서 추출될 수 있는 효소를 이용하는 방법.

청구항 3.

제 1 항에 있어서, 사포닌 알파 - 글루코시다제로 프로토평악사다이올계 진세노사이드를 가수분해하여 진세노사이드 Rh2를 제조할 수 있는 방법.

청구항 4.

제 1 항에 있어서, 사포닌 알파 - 람노시다제로 프로토평악사다이올계 진세노사이드 Re를 가수분해하여 진세노사이드 Rg1를 제조하고, 진세노사이드 Rg2를 가수분해하여서 진세노사이드 Rh1을 제조하는 방법.

청구항 5.

제 1 항에 있어서, 사포닌 분해효소로 인삼 혼합 사포닌을 처리하여서 진세노사이드 Rh2, Rh1 함량이 높은 혼합 사포닌을 제조하는 방법.

청구항 6.

제 1 항에 있어서 사포닌 분해효소를 생성하는 균(菌)을 직접 인삼 분말과 인삼 조각에 배양하여서 수삼, 백삼에는 존재하지 않거나, 미량 존재하는 사포닌의 함량이 높은 인삼 분말, 인삼 농축액, 인삼편 및 인삼 제품류를 얻을 수 있는 방법.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☒ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.